



TITLE:

新しい酵素法によるポリアミン測定について 第7報: 本法における組織中ポリアミン分別定量の基礎的検討

AUTHOR(S):

小出, 卓也; 酒井, 俊助; 河田, 幸道; 原, 明; 沢田, 英夫

CITATION:

小出, 卓也 ...[et al]. 新しい酵素法によるポリアミン測定について 第7報: 本法における組織中ポリアミン分別定量の基礎的検討. 泌尿器科紀要 1990, 36(10): 1103-1108

ISSUE DATE:

1990-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/117026>

RIGHT:

新しい酵素法によるポリアミン測定について

第7報 本法における組織中ポリアミン分別定量の基礎的検討

県立岐阜病院泌尿器科 (部長: 酒井俊助)

小出 卓也, 酒井 俊助

岐阜大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 河田幸道教授)

河 田 幸 道

岐阜薬科大学生化学教室 (主任: 沢田英夫教授)

原 明, 沢田 英夫

DETECTION OF POLYAMINES BY A NEW ENZYMATIC DIFFERENTIAL ASSAY

(7) FUNDAMENTAL STUDY ON A NEW ENZYMATIC
DIFFERENTIAL ASSAY OF TISSUE POLYAMINES

Takuya Koide and Shunsuke Sakai

From the Department of Urology, Gifu Prefectural Gifu Hospital

Yukimichi Kawada

From the Department of Urology, Gifu University School of Medicine

Akira Hara and Hideo Sawada

From the Department of Biochemistry, Gifu Pharmaceutical University

The enzymatic method for isolation and determination of urinary polyamines was modified to measure the polyamines in tissue. High recovery rates of polyamines in tissue by the enzymatic method were obtained, namely, $104.5 \pm 7.4\%$ for diamine, $104.7 \pm 23.3\%$ for spermidine and $104.8 \pm 7.5\%$ for spermine.

The results obtained by this method correlated well with those obtained by high performance liquid chromatography, and a close correlation was demonstrated for all fractions diamine $r=0.8991$, $y=0.9916x+0.0499$; spermidine $r=0.8936$, $y=1.2073x+0.1005$; spermine $r=0.8921$, $y=1.2200x-0.2194$. ($n=13$)

(Acta Urol. Jpn. 36: 1103-1108, 1990)

Key words: Polyamines in tissue, A new enzymatic method

緒 言

核酸や蛋白質の合成や安定化,あるいは細胞の増殖や機能的分化において重要な役割を示すポリアミンは,1971年 Russell ら¹⁾が癌患者における尿中ポリアミンの増加を報告して以来,腫瘍マーカーとして注目されており尿のほか血液・脳脊髄液など各種体液中で測定され臨床的に検討されている。しかし,従来の高速液体クロマトグラフ法²⁾やアミノ酸分析法³⁾などの測定法は,精度の点では優れているものの,特別な

機器や測定に長時間を要するなど臨床応用には問題があった。

われわれは,第1報~第5報⁴⁻⁸⁾において,基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素を用いて,尿中および血中ポリアミンを簡便に分別定量する方法を検討し,有用であるという結論を得ている。今回,この測定法を応用し,組織中のポリアミンの分別定量について,添加回収試験, HPLC 法との比較試験などの基礎的検討を加えたので報告する。

Table 1. Method for determination of diamine, spermidine and spermine

Reaction I	Spm., Spd., Put., Cad.
	Dia.
	Amount of H_2O_2 = Spd. + Put. + Cad.
Reaction II	Spm., Spd., Put., Cad.
	Dia.
	Amount of H_2O_2 = Spd. + Put. + Cad.
	Dia.
	Amount of H_2O_2 = 2 Spm.
	Amount of H_2O_2 = Spd. + Put. + Cad. + 2 Spm
	Dia.
Reaction III	Spm., Spd., Put., Cad.
	Dia.
	Amount of H_2O_2 = 2 Spm. + Spd.
Calculation of Diamine, Spermidine, Spermine	
Dia = $K(A_{II} - A_{III})$, Spd = $K(A_I + A_{III} - A_{II})$, Spm = $\frac{1}{2} K(A_{II} - A_I)$	

測定方法および測定材料

A : 測定原理 (Table 1)

本法はポリアミン類 (diamine = putrescine + cadaverine, spermidine, spermine) を下記の基質特異性の異なる 2 種類のアミン酸化酵素を用いて酸化し、この反応により生成される過酸化水素を比色定量することにより、diamine, spermidine および spermine を分別定量するものである。

プトレッシン酸化酵素 (PUO と略): putrescine, cadaverine, spermidine を酸化し、それぞれ 1 モル量の過酸化水素を生成させるが、spermine, モノアミン類、他のジアミン類は酸化しない。

ポリアミン酸化酵素 (PAO と略): spermidine, spermine を酸化し、それぞれ 1 モル量、2 モル量の過酸化水素を生成させるが、モノアミン類、ジアミン類をまったく酸化しない。

反応 I : PUO により diamine と spermidine を酸化する。この反応により得られる吸光度 (A_I) は diamine + spermidine の量を示す。

反応 II : PUO により diamine と spermidine を酸化する。つぎに PAO を添加し、未反応である spermine を酸化する。この反応により得られる吸光度 (A_{II}) は diamine + spermidine + 2・spermine

Table 2. Protocols for isolation and determination of diamine, spermidine and spermine in tissue

Tissue 0.5~1g		
Homogenization		
10% TCA 5ml		
Centrifugation 3000 r.p.m. 10min		
Supernatant		
Column chromatography addition 0.5N HCl		
Eluate		
Chromometry		
Reaction I (Spd + Dia)	Reaction II (25pm + Spd + Dia)	Reaction III (25pm + Spd)
Colour former 1.80 ml	Colour former 1.80 ml	Colour former 1.80 ml
Eluate 1.00 ml	Eluate 1.00 ml	Eluate 1.00 ml
Mixture 30°C 3min	Mixture 30°C 3min	Mixture 30°C 3min
PUO (90 U/ml) 50 μ l	PUO (180 U/ml) 40 μ l	3M NaH ₂ PO ₄ 150 μ l
Mixture 30°C 20min	Mixture 30°C 20min	PAO (40 U/ml) 50 μ l
3M NaH ₂ PO ₄ 150 μ l	3M NaH ₂ PO ₄ 150 μ l	Mixture 30°C 20min
Mixture	Mixture	
PAO (200 U/ml) 10 μ l	PAO (200 U/ml) 10 μ l	
Mixture 30°C 20min	Mixture 30°C 20min	
555 nm	555 nm	555 nm

の量を示す。

反応 III : PAO により spermine と spermidine を酸化する。この反応により得られる吸光度 (A_{III}) は spermidine + 2・spermine の量を示す。したがって diamine, spermidine, spermine の各量は次式により求められる (Table 1)。

$$\text{diamine} = K(A_I - A_{II})$$

$$\text{spermidine} = K(A_I + A_{III} - A_{II})$$

$$\text{spermine} = 1/2 K(A_{II} - A_I)$$

K : 色原体に由来する係数

B : 測定方法 (Table 2)

1) 組織ポリアミンの抽出および分離

組織片 (0.5~1.0 g) を精密に定量し、精製水 4 ml を加えポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズ後、精製水を加えて全量 10 ml とした。ホモジネート 5 ml に 10% トリクロロ酢酸 (TCA) 5 ml を加え、10 分間激しく攪拌した後、3,000 r.p.m. にて 10 分間遠心分離した。遠心分離した上清 5 ml に 0.5 M Bis-tris 3 ml を混和後、Amberlite CG-50 カラム 0.8×1.1 cm に添加した。精製水 4 ml で洗浄後、吸着したポリアミンを 0.5 N HCl 3 ml で溶出した。溶出液は、0.6 N NaOH を加えて pH 6~8 に調整後、精製水を加えて全量 5 ml とした。

2) Diamine, spermidine および spermine の分別定量

発色液 : 0.2 M ホウ酸ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.37) 135 ml に、4-アミノアンチピリン 10 mg, TOOS (N-ethyl-N(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-

N-toluidine-sodium-salt) 46 mg およびペルオキシダーゼ 2 mg を用時溶解した。

酵素液: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて, PAO は 40 U/ml と 200 U/ml の濃度に, PUO は 90 U/ml と 180 U/ml の濃度に希釈して使用した。

中和剤: 3M リン酸 2 水素ナトリウム溶液

反応: 中和したカラム溶出液 1.0 ml に発色液 1.8 ml を加え, 30°C にて反応 I, II, III を実施した。

反応 I では, 3 分間 preincubation 後, PUO (90 U/ml) 0.05 ml を加え, 20 分後, 中和剤 0.15 ml を添加して反応停止し, 反応液の 555 nm における吸光度 (A_I) を測定した。反応 II では, 3 分間 preincubation 後, PUO (180 U/ml) 0.04 ml を加え, 同様に 20 分後, 中和剤 0.15 ml で反応を停止させた。この反応液に, さらに PAO (200 U/ml) 0.01 ml を加え, 20 分反応後, 555 nm における吸光度 (A_{II}) を測定した。反応 III では, あらかじめ中和剤 0.15 ml を添加し, 3 分間 preincubation 後, PAO (40 U/ml) 0.05 ml を加え, 20 分間反応後, 反応液の 555 nm における吸光度 (A_{III}) を測定した。下記の計算式にて組織中ポリアミンの分別定量の値を求めた。各係数は putrescine, spermidine, spermine 標準液を用いて同様に操作し, その検量線と試料の希釈から求めたものである。

$$\text{diamine} = 2,400 \times (A_I - A_{II}) \text{ (nmol/ml)}$$

$$\text{spermidine} = 2,400 \times (A_I + A_{II} - A_{III}) \text{ (nmol/ml)}$$

$$\text{spermine} = 1,200 \times (A_{II} - A_{III}) \text{ (nmol/ml)}$$

3) 添加回収試験法

標準液: 1 mM の diamine, spermidine および spermine を含む 10% TCA 溶液

正常腎皮質組織 1.5 g を, 精製水 30 ml でポトリオンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネート 5 ml と, 対照として精製水 5 ml に, 標準液を, 0, 0.1, 0.2, 0.3 および 0.4 ml 加え, 10% TCA で全量 10 ml とした。以下の定量操作は, 1) 2) で前述した方法と同様に行い, 3 種類のポリアミンの回収率をそれぞれ求めた。

4) 高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法)

酵素法と同様に調製したカラム溶出液を試料として, Table 3 に示した HPLC の条件にて測定した。

G: 測定材料

1985年6月以降, 主として県立岐阜病院にて腎摘出術により得られた腎組織のうち, 肉眼的組織学的に正常と診断した腎皮質組織13例を, 測定まで -20°C で凍結保存して使用した。

Table 3. Conditions of HPLC

Apparatus	: LC-6A (Shimadzu)
Column	: ISC-05/S-0504 4mm ϕ ×5.0cm (Shimadzu)
Mobile phase	: 0.17M trisodium citrate 2.05M sodium chloride
OPT reagent	: 0.15M sodium tetraborate 0.5 g/l o-phthalaldehyde 0.5 g/l Brij 35 0.1% 2-mercaptoethanol 1.0% sodium hydroxide
Temperature	: column 70°C
Flow rate	: mobile phase 0.7ml/min OPT reagent 1.0ml/min
Detector	: FP-210 (Japan Spectroscopic Co.) Ex = 345 nm Em = 450 nm
Integrator	: SIC 7000B (System Instruments Co.)

結 果

1) 添加回収試験

標準液を用いた組織中ポリアミンの添加回収試験の結果を Fig. 1 に示す。diamine, spermidine, spermine の回収率はそれぞれ 104.5 \pm 7.4%, 104.7 \pm 23.3%, および 104.8 \pm 7.5 %であり, いずれも良好な成績が得られた。(n=5) また, diamine は 320 nmol/ml, spermidine と spermine は 140 nmol/ml の濃度まで, 各検量線は良好な直線性を示した。

2) HPLC 法との比較試験

正常腎皮質組織13例について, 本法と HPLC 法により測定し, 比較検討した。両者の測定結果を diamine, spermidine および spermine の別に Fig. 2 に示す。diamine における両者の間には, $r=0.8991$, $y=0.9916x+0.0499$, spermidine における両者の間には $r=0.8936$, $y=1.2073x+0.1005$, spermine における両者の間には $r=0.8921$, $y=1.2200x-0.2194$, の関係が認められた (n=13)。diamine, spermidine, spermine のいずれも, 本法と HPLC 法との間には良好な相関関係が得られた。

考 察

生体内におけるポリアミンの存在は約 300 年前より知られていた。しかし, それらの生合成過程や, 細胞内における機能が明らかにされてきたのは近年のことであり, とくに 1971 年 Russell ら¹⁾ によって癌患者尿中へのポリアミン排泄増加が報告され, 癌の有力な診断法として提唱されて以来一躍臨床的に注目されてきた。

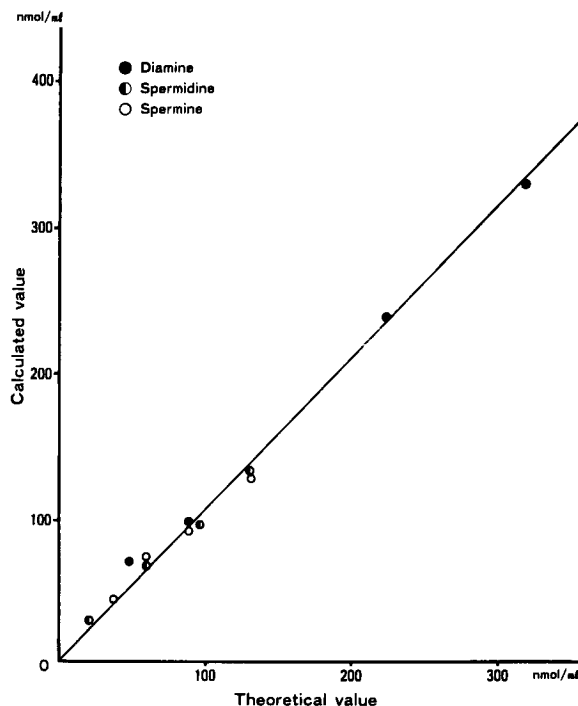


Fig. 1. Recovery of polyamines in tissue

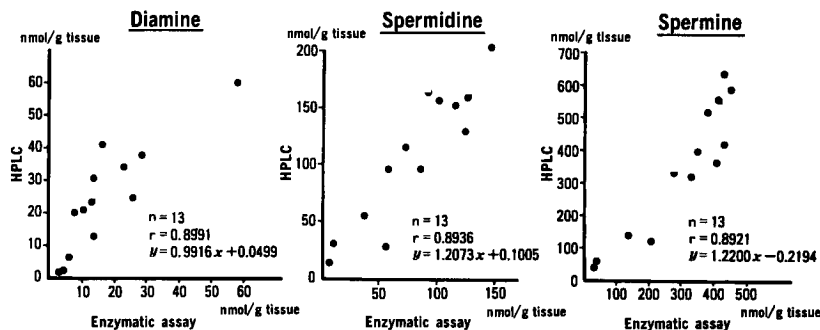


Fig. 2. Correlation between the enzymatic and HPLC assays of tissue polyamines

動物細胞における主なポリアミンは、putrescine, spermidine, spermine であるが、これらは Fig. 3 に示す経路で生合成される⁹⁾。putrescine は ornithine 脱炭酸酵素によって ornithine から生成される。putrescine に S-adenosylmethionine の脱炭酸生成物の aminopropyl 基が結合して spermidine が生成され、さらにもう 1 分子の aminopropyl が付加されて spermine が生成される。増殖組織や腫瘍組織では、この ornithine 脱炭酸酵素や S-adenosylmethionine 脱炭酸酵素の活性が高いので、腫瘍組織中では putrescine 含量が上昇し、さらに spermine

や spermidine も上昇すると考えられている¹⁰⁾。

腫瘍組織中のポリアミンに関しては、種々の疾患の報告が散見される。Harik ら¹¹⁾ は、脳腫瘍のなかで astrocytoma では putrescine 濃度が増加するが、それは組織学的な悪性度と良く相関すると報告し、Matsuzaki ら¹²⁾ は甲状腺の腺癌でも putrescine の増加が特徴的であり、甲状腺の良性疾患では putrescine の増加が認められなかったとしている。さらに結腸直腸癌において N¹-acetylspermidine が特異的に上昇しているという竹之下ら¹³⁾の報告もある。

泌尿器科領域においても、腎細胞癌、腎盂腫瘍、膀

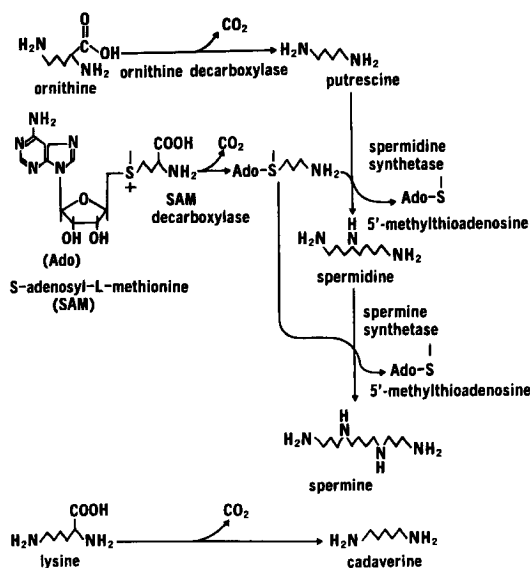


Fig. 3. Biosynthesis of polyamines in mammary cells

膀胱腫瘍などの報告がみられる¹⁴⁻¹⁶⁾。湯浅ら¹⁴⁾は、膀胱腫瘍、睾丸腫瘍などにおいて腫瘍組織における putrescine, spermidine, spermine がそれぞれ正常組織に比し高値を示すと報告し、松田ら¹⁵⁾は、腎細胞癌の病理組織学的悪性度と組織中の spermidine 含量、および putrescine/spermidine 比, spermidine/spermine 比の値が相関を示すと報告しており、いずれも腫瘍組織中ポリアミン測定の実用性を示唆している。

しかし、これらの測定は、アミノ酸分析法¹²⁾、HPLC 法¹³⁾、ダンシル化薄層クロマトグラフ法¹⁴⁻¹⁶⁾などが使用されており、精度の点では優れているものの特別な機器や測定に長時間を要するなど臨床応用には問題があった。われわれは、第1報から第5報⁴⁻⁸⁾において、基質特異性の異なる2種類のアミノ酸化酵素を用いた簡便なポリアミン分別定量法を用い、尿路生殖器癌患者における血液および尿中のポリアミンについて検討してきた。一方、現在まで酵素法を用いた組織中のポリアミン測定は報告されておらず、この簡便な方法で測定可能であれば、その臨床的意義は非常に大きいと思われる。そこで今回、この酵素法を応用し組織中ポリアミン測定を試みた。

本法は、組織中のポリアミンを TCA 溶液に抽出しカラムクロマトグラフィーで部分精製後、尿中ポリアミンの測定法と同様の方法で測定するものである。添加回収試験では、diamine, spermidine, spermine のいずれもが良好な成績を得た。また、ポリアミン測

定において現在のところ最も信頼性が高いと思われる HPLC 法との比較検討でも、diamine, spermidine, spermine のいずれも良好な成績が得られた。

以上より、本法は血液および尿だけでなく、組織中のポリアミン測定においても有用と思われる。今後、従来法と比較し、測定に要する時間が大幅に短縮でき、高度な機器が不用で全操作が一般の検査室レベルで可能といった特徴をもつ本法を用い、尿路生殖器腫瘍の組織について臨床的に検討していきたい。

結 語

1) 第1報において報告した新しい簡便な酵素法による尿中ポリアミン分別定量法を変法し、腎皮質組織中ポリアミンの分別定量を行い、その基礎的検討を加えた。

2) 添加回収試験の結果は、diamine $104.5 \pm 7.4\%$, spermidine $104.7 \pm 23.3\%$, spermine $104.8 \pm 7.5\%$ であり、いずれも良好な成績を示した。

3) HPLC 法との比較試験では、diamine, spermidine, spermine のいずれも良好な相関関係が得られた。

文 献

- 1) Russell DH, Levy CC, Schimpff SG and Hawk IA: Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res* 31: 1555-1558, 1971
- 2) 植原典美, 佐伯行一, 白川 茂, 堂前尚親, 内野治人: 癌患者における赤血球ポリアミン量の検討. *医学のあゆみ* 107: 23-25, 1978
- 3) Takami H, Romsdahl MW and Nishioka K: Polyamines in blood cells as a cancer marker. *Lancet* II: 912, 1979
- 4) 酒井俊助, 伊藤康久, 小出卓也, 鄭 漢彬, 原明, 沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第1報, 本法における尿中ポリアミン分別定量の基礎的検討. *泌尿紀要* 32: 327-336, 1986
- 5) 酒井俊助, 伊藤康久, 小出卓也, 鄭 漢彬, 原明, 沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第2報, 本法と他の尿中ポリアミン測定法の比較検討. *泌尿紀要* 32: 337-341, 1986
- 6) 酒井俊助, 伊藤康久, 小出卓也, 鄭 漢彬, 原明, 沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第3報, 尿路生殖器癌患者における尿中ポリアミン分別定量, *泌尿紀要* 32: 343-350, 1986
- 7) 小出卓也, 酒井俊助, 武田明久, 土井達朗, 鄭 漢彬, 原明, 沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第4報, 本法における血中ポリアミン分別定量の基礎的検討. *泌尿紀要* 32: 913-917, 1986
- 8) 小出卓也, 酒井俊助, 篠田育男, 説田 修, 鄭

- 漢彬, 原 明, 沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第5報, 尿路性器癌患者における血中ポリアミン分別定量. 泌尿紀要 **32**: 919-928, 1986
- 9) 永津俊治, 松井俊和, 新保 寛, 藤田啓介: ポリアミン生体内動態と代謝. 臨床病理 **59**: 23-28, 1984
- 10) 井上秀夫: ポリアミンの生合成とその調節. 代謝 **9**: 1010-1017, 1972
- 11) Harik SI and Sutton CH: Putrescine as a biochemical marker of malignant brain tumors. *Cancer Res* **39**: 5010-5015, 1979
- 12) Matsuzaki S, Suzuki M, Hamana K and Itoh K: Elevated levels of polyamines and histamine in adenocarcinomas of the thyroid. *J Clin Endocrinol* **47**: 1038-1041, 1978
- 13) 竹之下誠一: 大腸癌の組織内ポリアミンに関する生化学的研究. 大腸肛門誌 **38**: 689-695, 1985
- 14) 湯浅 誠, 前林浩次, 香川 征: 泌尿器科領域におけるポリアミン, 第2報, 尿路腫瘍及び前立腺肥大症における組織内ポリアミン. 日泌尿会誌 **73**: 875-882, 1982
- 15) 松田 稔, 長船匡男, 中野悦次, 園田孝夫, 清原久和: ヒト腎細胞癌の基礎的研究, 第4報, 腫瘍組織内ポリアミン類の含量について. 泌尿紀要 **25**: 1239-1245, 1979
- 16) 清原久和: 膀胱腫瘍の生化学的指標に関する研究—膀胱癌組織内ポリアミン含量について. 日癌治誌 **19**: 820-831, 1984
- (Received on December 20, 1989)
(Accepted on March 2, 1990)